

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 151–153

Über eine Schnellmethode zur Bestimmung von Serotonin im Harn

Die direkte quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen durch Remissions- und Fluoreszenzmessungen, 7. Mitteilung

Von H. E. Geißler und E. Mutschler

Fachbereich Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

(Eingegangen am 31. Oktober 1973/18. Februar 1974)

Es wird die Bestimmung des freien Serotonins aus Harn durch direkte quantitative Fluoreszenzmessung auf Dünnschicht-Platten beschrieben. Das Verfahren beruht auf der Umsetzung des Serotonins im Harn mit Acetanhydrid zu O,N-Diacetylserotonin, nachfolgendem Phasenwechsel, dünnschichtchromatographischer Abtrennung und Reaktion mit o-Phthaldialdehyd auf der Dünnschicht-Platte. Die Auswertung erfolgt entweder halbquantitativ auf visuellem Wege oder durch spektralfluorimetrische „in-situ“-Messung. Die Reproduzierbarkeit des letzteren Verfahrens liegt unterhalb einer relativen Standardabweichung von 6 %. Die beschriebene Methode ist mit beiden Verfahren wegen ihrer Einfachheit und Schnelligkeit der Durchführung zu Reihenuntersuchungen, wie z. B. zur Diagnose des Carcinoids, geeignet.

*The direct quantitation of thin layer chromatograms by remission- and fluorescence measurement.
7. A rapid method for the determination of serotonin in urine*

The estimation of free serotonin in urine by direct quantitative fluorimetry by thin layer chromatography is described. The method is based on the reaction of urinary serotonin with acetic anhydride to form O,N-diacetylserotonin, extraction into an organic phase, thinlayer chromatographic separation and reaction with o-phthaldialdehyde directly on the thin layer plate. The quantitative estimation is carried out either by semi-quantitative visual evaluation or spectrofluorometric "in-situ" measurement. The reproducibility of the latter procedure is below a relative standard deviation of 6%. Because of their simplicity and rapidity the described methods are suited for screening tests, for example the diagnosis of the carcinoid-syndrome.

Trotz zahlreicher Untersuchungen ist die physiologische Funktion des biogenen Amins Serotonin noch weitgehend unbekannt. Von klinischer Bedeutung ist das Carcinoid-Syndrom, bei dem es durch vermehrte Serotoninproduktion zu den bekannten Symptomen (Flush, Diarrhoe, Leibschmerzen usw.) kommt. Zur Sicherung der Diagnose ist es erforderlich, eine Serotoninbestimmung aus dem Harn durchzuführen. Die bisher in der Literatur bekannten Methoden (vgl. l.c. 1–6) sind entweder wenig spezifisch oder erfordern einen erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand. Serotoninbestimmungen werden daher bisher nur an wenigen großen Kliniken durchgeführt. Für die wünschenswerte, nahezu in jedem Laboratorium ausführbare Routineuntersuchung ist eine einfache und schnelle Bestimmungsmethode notwendig. Im folgenden wird eine solche Methode beschrieben. Sie beruht auf der direkten fluorimetrischen Bestimmung des Serotonins nach dünnschichtchromatographischer Trennung seines Diacetylderivates und Umsetzung mit o-Phthaldialdehyd auf der Dünnschicht-Platte. Im einfachsten Fall ist eine visuelle Auswertung möglich, mit deren Hilfe stärkere Abweichungen des Serotoningehaltes von der Norm erfaßt werden können.

Zuverlässige Meßwerte werden durch die direkte quantitative fluorimetrische Messung mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer (Carl Zeiss) erhalten.

Methodik

Allgemeine Beschreibung des Verfahrens

10,0 oder 20,0 ml Harn werden mit Natriumhydrogencarbonat und Acetanhydrid versetzt, nach der Reaktion mit der gleichen Menge Dichlormethan geschüttelt und zentrifugiert. Die überstehende wäßrige Phase wird verworfen und die Hälfte der organischen Phase in speziellen Gefäßen eingeeengt. Ein Teil der eingeeengten Lösung wird zur Chromatographie verwendet. Die Oxidationsstabilisierung des abgetrennten Diacetylserotonins erfolgt auf der Platte durch Schwefeldioxid und die Umsetzung zu einem fluoreszierenden Produkt durch Besprühen mit einem o-Phthaldialdehyd enthaltenden Reagenz in Chlorwasserstoffatmosphäre. Die beiden Reinigungsschritte – Phasenwechsel und Chromatographie – und die Selektionierung durch die Reaktion mit einem Reagenz führen in den meisten Fällen zu einer spezifischen Erfassung des Serotonins. Die Bestimmung erfolgt entweder halbquantitativ durch visuelle Auswertung unter ultraviolettem Licht der Wellenlänge 365 nm oder exakt durch spektralfluorimetrische Messung gegen einen mitchromatographierten Standard aus O,N-Diacetylserotonin (Synthese der Vergleichssubstanz s. Anhang).

Arbeitsvorschrift**Vorbereitung des Harns**

Während des 24-stündigen Sammelns wird der Harn ohne Zusatz von Stabilisatoren eingefroren. Vor der Analyse wird die zur Bestimmung verwendete Probe zentrifugiert oder filtriert. Wenn infolge einer mangelnden Geräteausrüstung nur eine visuelle Bestimmung möglich ist, wird der 24-h-Harn mit Wasser auf 1 bzw. 2 l aufgefüllt, um den Vergleich zu erleichtern.

Herstellung des zur Chromatographie geeigneten Extraktes

10,0 ml bzw. bei größeren Harnmengen 20,0 ml Harn werden in einer Schüttelbirne von etwa 30 ml Inhalt mit 1,7 g Natriumhydrogencarbonat und 1,0 ml Acetanhydrid versetzt. Nach Beendigung der Kohlendioxidentwicklung wird das gleiche Volumen an eisgekühltem Dichlormethan hinzugefügt, die Mischung kräftig geschüttelt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wird abgesaugt und verworfen. Von der etwa mit 1 g getrocknetem Natriumsulfat versetzten organischen Phase werden nach erneutem Zentrifugieren 5,0 bzw. 10,0 ml entnommen und in einem 15 ml fassenden Glasgefäß, das an einer unten angebrachten, auf etwa 4 mm verjüngten Spitze eine 500 µl-Marke besitzt, im Wasserbad bei etwa 50° C bis zur Trockne eingedampft. Die Gefäßwand wird mit 0,5 ml Dichlormethan nachgespült. Dann wird erneut eingedampft und die verdampfte Menge unter Nachspülen der Gefäßwand bis zur 500 µl-Marke ergänzt.

Chromatographie

Die Chromatographie erfolgt mit dem Fließmittel Dichlormethan/Aceton/Ameisensäure (Volumina 80 ml + 15 ml + 5 ml) und einer Fließstrecke von 15 cm auf Kieselgel-G-Fertigplatten „Merck“ ohne Fluoreszenzindikator. Am oberen Rand der Dünnschicht-Platte wird in einer Breite von etwa 2 cm die Schicht entfernt. Im Abstand von 1 cm werden 16 Startflecke markiert. Die zu chromatographierenden Lösungen werden mit einer Mikrometerspritze (7) oder mit Mikrokonstriktionspipetten aufgetragen. Auf 6 gleichmäßig über die Platte verteilte Startflecke werden je 10 µl Vergleichslösung (Herstellung der Vergleichslösung s. Anhang) und auf die übrigen 10 Startflecke je 20 µl des Harnextraktes aufgetragen. 10 µl Eichlösung entsprechen 30 ng Serotonin. Pro Platte werden bei Doppelbestimmungen 5 Harnproben ausgewertet. Bei Harnen mit geringerem Serotoningehalt können die aufgetragenen Mengen verdoppelt werden, ohne daß durch die Begleitsubstanzen eine Störung auftritt. Nach der Chromatographie wird die Dünnschicht-Platte noch feucht mit dem oberen von der Schicht befreiten Rand nach unten etwa 1 Minute lang in eine 1 cm hoch mit schwefliger Säure (5–6 % SO₂) beschickte Kammer gestellt.

Fluoreszenzreaktion

Nach dem Abdampfen des Fließmittels in der Schwefeldioxid-Kammer wird die Dünnschicht-Platte mit etwa 80 ml des fein vernebelten o-Phthaldialdehyd-Reagenzes befeuchtet. Das Reagenz besteht aus Methanol/schwefliger Säure (5–6 % SO₂)/Äther (Volumina 30 ml + 15 ml + 55 ml) mit 100 mg o-Phthaldialdehyd und wird durch einen mit Preßluft betriebenen Dünnschicht-Sprüher aus etwa 50 cm Entfernung gleichmäßig aufgesprüht. Danach wird die Platte 30 Minuten lang in eine mit Chlorwasserstoffgas gefüllte Kammer gestellt, die am Boden trockene Salzsäure enthält. Anschließend läßt man an der Luft rauchende. Vor der Messung wird die Platte in einem mit gesättigter Kalilauge beschickten Exsikkator aus Braunglas aufbewahrt, um die größte Menge Chlorwasserstoff zu beseitigen, und dann noch im Meßraum zum Äquilibrieren belassen.

Fluoreszenzmessung und Auswertung**Visuelles Verfahren**

Beim visuellen Verfahren wird unter ultravioletter Licht von 365 nm festgestellt, ob die vom Serotonin der Harnprobe verursachte Fluoreszenzintensität größer, gleich oder kleiner ist als die durch jeweils 30 ng Serotonin hervorgerufene Fluoreszenzintensität der Vergleichsflecke. Da bei der Herstellung des Extraktes für das visuelle Auswertungsverfahren 10,0 ml Harn eines auf 1000 ml aufgefüllten 24-h-Harnes bzw. 20,0 ml eines auf 2000 ml aufgefüllten Harnes verwendet wurden, entspricht nach der oben beschriebenen Aufarbeitung die aufgetragene Extrakt-

menge von 20 µl dem 2 mal 10⁻⁴ fachen Teil des 24-h-Harnes. Da bei dem Verfahren etwa 75 % der vorhandenen Serotoninmenge wiedergefunden wurden, entspricht eine gleiche Fluoreszenzintensität von Probe und Vergleichsfleck einem Serotoningehalt von etwa 200 µg im 24-Stunden-Harn.

Spektralfluorimetrisches Verfahren

Die spektralphotometrische Fluoreszenzmessung erfolgt mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen. Es wird folgende Meßanordnung gewählt: Leuchte mit Quarzkondensor, Monochromatfilter, Dünnschicht-Platte, einschwenkbarer Begrenzungsspalt, einschwenkbare Sammellinse, Monochromator, Einsteckblende 3,5 mm, Empfänger.

Zur Anregung wird die Hg-Linie bei 365 nm der Hg-Mitteldrucklampe St. 41 benutzt. Der Monochromatorspalt wird bei 470 nm auf 1,5 mm geöffnet. Abbildung 1 zeigt das unkorrigierte, in Reflexion von der Dünnschicht-Platte aufgenommene Emissionsspektrum des Fluoreszenzproduktes aus Diacetylserotonin und o-Phthaldialdehyd.

Jeder Fleck wird zunächst auf dem Kreuztisch positioniert. Die Messung erfolgt in Fließrichtung des Chromatogramms. Ein Schreiber zeichnet die resultierende relative Fluoreszenzintensitäts-Ortskurve auf.

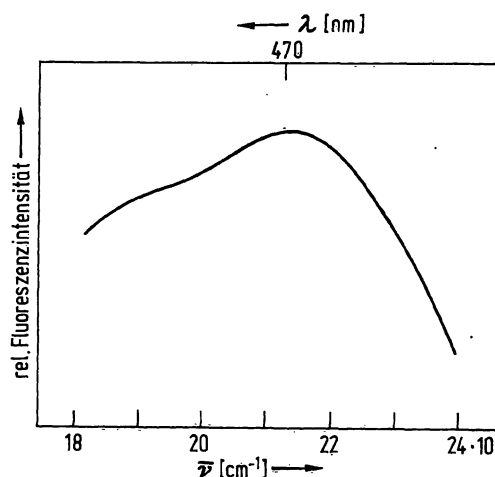


Abb. 1. Unkorrigiertes, in Reflexion von der Dünnschichtchromatographie-Platte aufgenommenes Emissionsspektrum des Fluoreszenzproduktes aus Diacetylserotonin und o-Phthaldialdehyd. Exzitation: Hg-Linie 365 nm. Abszisse: Wellenlänge λ (nm) bzw. Wellenzahl $\bar{\nu}$ (cm⁻¹).

Abbildung 2 zeigt eine solche Fluoreszenzintensitäts-Ortskurve über die gesamte Laufstrecke des Chromatogramms. Die Kurvenhöhe entspricht der relativen Fluoreszenzintensität des durch die jeweils verwendete Optik erfaßten Areals. Zur Auswertung wird der Mittelwert der Peakhöhen von 5 Vergleichsflecken gebildet. Jeder Vergleichsfleck entspricht – wie oben angegeben – 30 ng Serotonin. Da bei der geschilderten Methodik von 0 bis 30 ng Linearität zwischen den Substanzmengen und den Kurvenhöhen besteht, kann die Vergleichsgerade aus dem 0-Punkt und dem Koordinatenpunkt P (30 ng) gebildet werden. Die unbekannten Substanzmengen werden entweder über die zugehörigen Kurvenhöhen (H) an diesen Vergleichsgeraden graphisch bestimmt oder einfacher rechnerisch ermittelt nach $30 \cdot H = X$ ng Serotonin pro Chromatogramm-Fleck. Von jeder Harnprobe werden zwei Chromatogrammflecke ausgewertet und davon der Mittelwert gebildet.

Ergebnisse**Visuelle Methode**

Durch Abschätzen der Fluoreszenzintensitäten von Probe und Vergleichsfleck läßt sich mit einer Genauigkeit von etwa 25% sagen, ob die Substanzmenge der Probe kleiner oder gleich bzw.

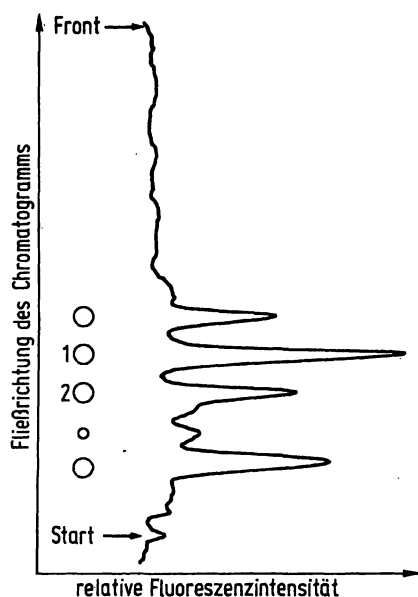


Abb. 2. Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven eines nach der beschriebenen Methode hergestellten Chromatogramms von Harnextrakt. 1 = Serotonin; 2 = (5-Hydroxy-indol-3)-essigsäure.

größer ist als die Substanzmenge des Vergleichsflecks. Wie oben ausgeführt, entspricht eine Menge von 30 ng in der Probe einem Gehalt von 200 µg Serotonin im 24-h-Harn. Als Normalwerte des Gehaltes an freiem Serotonin werden von Korf (5)

30–120 µg/24 h und von Arterberry und Conley (4) $5,38 \pm 1,95$ µg/h im Harn angegeben. Eigene Untersuchungen an 35 Patientenharnen lagen innerhalb dieser Grenzen. Mit der visuellen Methode können demnach Abweichungen von den Normalwerten nach oben gut erkannt werden.

Spektralfluorimetrische Methode

Die Reproduzierbarkeit der spektralfluorimetrischen Methode wurde auf die Weise ermittelt, daß vier verschiedene Harne an 10 aufeinander folgenden Tagen jeweils einmal bestimmt wurden. Zwischen den einzelnen Bestimmungen wurden die Harne bei -20°C eingefroren. Die Standardabweichung aus den vier Bestimmungsreihen betrug im Mittel 5,5 %. Die Wiederfindungsrate von verschiedenen zu Harn verschiedener Herkunft aufgestockten Serotoninmengen betrug 75 %.

Anhang

Synthese des O,N-Diacetylserptonins und Herstellung der Vergleichslösung

1,62 g Serotonin-Kreatinin-Sulfat werden in 40 ml Wasser gelöst, mit 7 g Natriumhydrogencarbonat und 2 ml Acetanhydrid versetzt. Nach Beendigung der Kohlendioxidentwicklung wird zweimal mit 40 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und der Dichlormethanauszug zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Aceton aufgenommen und mit Aether zur Kristallisation gebracht.

Zur Herstellung der Vergleichslösung werden 44,3 mg Diacetylserotonin in 100,0 ml Dichlormethan gelöst. 1,00 ml davon mit Dichlormethan zu 100,0 ml verdünnt ergibt die Vergleichslösung.

Danksagung

Frau M. Dindorf und Frl. M. Singer danken wir für die gewissenhafte Mithilfe bei der praktischen Durchführung der Analysen.

Literatur

1. Bogdanski, D. F., Pletscher, A., Brodie, B. B. & Udenfriend, S. (1956), J. Pharmacol. Exp. Ther. 117, 82–88
2. Oates, J. A. (1961), in Methods of Medical Research (Quastel, J. H., Hrsg.) Vol. 9, p. 169–174, Year Book Med. Publ., Chicago
3. Davis, V. E., Huff, J. A. & Brown, H. (1965), J. Lab. Clin. Med. 66, 390–402
4. Arterberry, J. D. & Conley, M. P. (1967), Clin. Chim. Acta 17, 431–440
5. Korf, J. (1969), Clin. Chim. Acta 23, 483–487
6. Wall, R. A. (1971) J. Chromatogr. 60, 195–202
7. Geißler, H. E. & Mutschler E. (1971), J. Chromatogr. 56, 271–279

Dr. H. E. Geißler und
Prof. Dr. Dr. E. Mutschler,
Fachbereich Pharmazie,
65 Mainz, Saarstr. 21